

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-309148
(43)Date of publication of application : 24.11.1998

(51)Int.CI. A01K 67/027
C12N 15/09
// C12N 5/10
C12P 21/02

(21)Application number : 09-247346 (71)Applicant : KISHIMOTO CHUZO
(22)Date of filing : 11.09.1997 (72)Inventor : KOMORI HISAFUMI
KISHIMOTO CHUZO

(30)Priority
Priority number : 09 74453 Priority date : 10.03.1997 Priority country : JP

(54) TRANSGENIC ANIMAL LACKING IN OSTEOGENESIS FUNCTION

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a transgenic animal useful for clarifying the *in vivo* function of a core-binding factor/polyoma enhancer-binding protein (CBFA1/PEBP2 α A) by introducing a mutation into a gene encoding the CBFA1/PEBP2 α A.

SOLUTION: This transgenic animal is obtained by introducing a mutation in the runt region DNA in a gene encoding CBFA1/PEBP2 α A to inhibit the differentiation maturity of osteoblast. The transgenic animal lacking in osteogenesis function is prepared by introducing the mutation of a gene encoding CBFA1/PEBP2 α A into an animal such as rat.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-309148

(43)公開日 平成10年(1998)11月24日

(51) Int.Cl.⁶
A 01 K 67/027
C 12 N 15/09
// C 12 N 5/10
C 12 P 21/02

識別記号

F I
A 01 K 67/027
C 12 P 21/02
C 12 N 15/00
5/00

C
A
B

審査請求 未請求 請求項の数10 O L (全 19 頁)

(21)出願番号 特願平9-247346
(22)出願日 平成9年(1997)9月11日
(31)優先権主張番号 特願平9-74453
(32)優先日 平9(1997)3月10日
(33)優先権主張国 日本 (JP)
特許法第30条第1項適用申請有り 平成8年10月12日
第55回日本癌学会総会のワークショップにおいて文書を
もって発表

(71)出願人 000157865
岸本 忠三
大阪府富田林市中野町3丁目5番31号
(72)発明者 小守 寿文
大阪府茨木市美穂ヶ丘19 D1101
(72)発明者 岸本 忠三
大阪府富田林市中野町3丁目5-31
(74)代理人 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 骨形成能欠損トランスジェニック動物

(57)【要約】

【課題】コア結合因子／ポリオーマエンハンサー結合蛋白質 (CBFA1/PEBP2 α A)の生体内での機能を解明するために有用なCBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子に変異を導入させたトランスジェニック動物および該トランスジェニック動物の作製方法を提供すること。

【解決手段】CBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子に変異を導入させてなるトランスジェニック動物および動物にCBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子の変異を導入することを特徴とする骨形成能欠損トランスジェニック動物の作製方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 コア結合因子／ポリオーマエンハンサー結合蛋白質 (CBFA1/PEBP2 α A)をコードする遺伝子に変異を導入させてなるトランスジェニック動物。

【請求項2】 CBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子内のrunt領域D N Aに変異を導入させてなる請求項1記載のトランスジェニック動物。

【請求項3】 CBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子の少なくとも一部を欠損させる変異を導入させてなり、かつ、骨形成能が欠損した請求項1または2記載のトランスジェニック動物。

【請求項4】 骨芽細胞の分化成熟阻害が生じている請求項1～3いずれか記載のトランスジェニック動物。

【請求項5】 トランスジェニック動物がホモ変異動物である請求項1～4いずれか記載のトランスジェニック動物。

【請求項6】 トランスジェニック動物がヘテロ変異動物である請求項1または2記載のトランスジェニック動物。

【請求項7】 請求項6記載のトランスジェニック動物を交配させて得られる請求項5記載のトランスジェニック動物。

【請求項8】 動物がマウスである請求項1～7いずれか記載のトランスジェニック動物。

【請求項9】 動物にCBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子の変異を導入することを特徴とする、骨形成能欠損トランスジェニック動物の作製方法。

【請求項10】 CBFA1/PEBP2 α Aをコードする遺伝子の少なくとも一部からなる骨形成用D N A。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、骨形成能欠損トランスジェニック動物に関する。さらに詳しくは、CBFA1/PEBP2 α A遺伝子に変異を導入して得られる骨形成能欠損トランスジェニック動物および該骨形成能欠損トランスジェニック動物の作製方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 コア結合因子 (CBFA1)はポリオーマエンハンサー結合蛋白質 (PEBP2 α A)とも呼ばれるものであり、runt領域を有する遺伝子ファミリーに属する転写因子の一つである。これまでに、3つのrunt領域を有する遺伝子 (CBFA1/PEBP2 α A, CBFA2/PEBP2 α B, CBFA3/PEBP2 α C)が同定されている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6859-6863(1993)、Oncogene 8, 809-814(1993)、Gene 159, 245-248(1995))。これらの転写因子は、ショウジョウバエのペアルール遺伝子であるrunt遺伝子がコードするアミノ酸配列と非常に相同性の高いrunt領域と呼ばれるDNA結合領域を持っている (Genes Dev. 4, 1701-1713(1990))。また、これらの転写因子は共役転写因子であるCBFB/PEBP2 β とヘテロ2量体を形成し、それによりDN

A結合活性が高められることがin vitroで示されている (Virology 194, 314-331(1993)、Mol. Cell. Biol. 13, 3324-3339(1993))。

【0003】 CBF/PEBP2はPuACCPuCAというコンセンサス配列を特異的に認識するが、この配列は、元々はポリオーマウイルスのエンハンサー内で (J. Virol. 64, 4808-4819(1990)、また齧歯類の白血病ウイルスのエンハンサー内で (Mol. Cell. Biol. 12, 89-102(1992))、同定されていたものである。該コンセンサス配列はまた、T細胞特異的遺伝子 (TCR α , TCR β , TCR δ , TCR γ , CD3 ϵ) (Genes Dev. 9, 995-1008(1995)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 9934-9938(1992)、Mol. Cell. Biol. 12, 4817-4823(1992)、J. Immunol. 150, 3905-3916(1993)、Nucl. Acids Res. 20, 6495-6499(1992))、酵素遺伝子 (ミエロペルオキシダーゼ、好中球エラスター、グランザイムBセリンプロテアーゼ) (Mol. Cell. Biol. 14, 5558-5568(1994)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 6930-6934(1995))、サイトカイン遺伝子とその受容体遺伝子 (GM-CSF, IL3, CSF-1) (Oncogene 11, 2667-2674(1995)、Blood 86, 607-616(1995)、Blood 83, 2851-2859(1994)、Mol. Cell. Biol. 14, 8085-8095(1994))でも見つかっている。最近の研究では、CBF/PEBP2関連因子がオステオカルシン遺伝子のプロモーター領域に結合することが示されている (J. Biol. Chem. 270, 30973-30979(1995)、Biochemistry 34, 13125-13132(1995)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4968-4973(1996))。

【0004】 またCBFA2/PEBP2 α B/AML1とCBFB/PEBP2 β は、急性骨髓性白血病において染色体転座を頻繁に起こしている (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10431-10434(1991)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7784-7788(1993)、EMBO J. 13, 504-510(1994)、Blood 85, 3662-3670(1995)、Science 261, 1041-1044(1993))。CBFA2/PEBP2 α B/AML1は、マウスの胎児と成体各組織で広く発現しており (Dev. Dyn. 203, 61-70(1995)、Mol. Cell. Biol. 15, 1662-1670(1995))、また、CBFB/PEBP2 β は普遍的に発現している (Virology 194, 314-331(1993)、Mol. Cell. Biol. 13, 3324-3339(1993)、Mol. Cell. Biol. 15, 1662-1670(1995))。CBFA2/PEBP2 α B/AML1とCBFB/PEBP2 β とのヘテロ2量体化は、in vitroでこの2量体がDNAに結合するのに必要である (Virology 194, 314-331(1993)、Mol. Cell. Biol. 13, 3324-3339(1993))。CBFA2/PEBP2 α B/AML1の遺伝子破壊を行なうと、中枢神経系における出血により妊娠中期に胎生致死が起きる。また、肝臓における胎児性造血が欠損する。CBFB/PEBP2 β 欠損マウス (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12359-12363(1996)、Cell 87, 697-708(1996))の表現型は、CBFA2/PEBP2 α B/AML1欠損マウス (Cell 84, 321-330(1996)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 3444-3449(1996))の表現型とほぼ同一である。従ってCBFB/PEBP2 β は、in vivoでのCBFA2/PEBP2 α B/AML1の機能に必須であると考えられる。CBFB/PEBP2 β はま

た、CBFA1/PEBP2 α A の in vitro での DNA 結合にも必要であることから (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6859-6863 (1993))、CBFA2/PEBP2 α B/AML1 は、runt 領域を有する遺伝子ファミリーのなかでは、胎児発生において最も早期から必要な遺伝子であることが示唆される (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 12359-12363 (1996)、Cell 87, 697-708 (1996))。

【0005】それに対し、CBFA1/PEBP2 α A の発現に関しては、T 細胞株と NIH3T3 細胞では発現が検出されるが、B 細胞株では検出されない (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6859-6863 (1993))。また胸腺と精巢では発現が検出されるが、脳、肺、心臓、脾臓、肝臓及び腎臓を含む組織においては検出されない (Mol. Cell. Biol. 15, 1662-1670 (1995))。かかる知見において一致していることは、T 細胞受容体 α 、 β 、 γ 、 δ 遺伝子を含む多くの T 細胞特異的遺伝子の調節領域中に CBF/PEBP2 結合部位があるということ、そして CBFA1/PEBP2 α A は T 細胞受容体 β のエンハンサーに結合し、in vitro でのエンハンサー活性を刺激するということである (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6859-6863 (1993))。かかる知見は、CBFA1/PEBP2 α A は T リンパ球特異的な遺伝子転写制御に何らかの役割を果たしているものと考えられる (Mol. Cell. Biol. 15, 1662-1670 (1995))。しかし in vivo での CBFA1/PEBP2 α A の機能については解明されていない。

【0006】ところで、骨格組織は間葉系細胞の様々な種類から成り立っている。すなわち、骨芽細胞、軟骨細胞、筋芽細胞及び脂肪細胞を含む骨髓ストローマ細胞から成り立っている。これらの細胞系列は共通の間葉系起源細胞から分化していると考えられている (Osteoblastic lineage. In Cellular and Molecular Biology of Bone, M. Noda, ed. (London Academic Press), pp. 1-45. (1993))。これらの間葉系起源細胞は、分化の過程でその細胞系列の分化段階に応じて特異的な表現系を獲得していく。骨格筋の場合では、塩基性 Helix-Loop-Helix ファミリーに属する筋特異的な転写因子である MyoD ファミリーが、筋細胞系列の分化を決定付けるのに必要である (Cell 75, 1241-1244 (1993))。また、脂肪細胞系列への分化を決定付けるには、PPAR γ 2 (peroxisome proliferator-activated receptor γ 2) が重要な役割を果たしている (Cell 79, 1147-1156 (1994))。しかしながら、骨芽細胞系列への分化を決定付ける特異的な転写因子はいまだ明らかにされていない。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、CBFA1/PEBP2 α A の生体内での機能を解明するために有用な CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子に変異を導入させたトランジェニック動物および該トランジェニック動物の作製方法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明者らは CBFA1/PEBP2 α A の機能を解明するために、ジーンターゲッティングにより、CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子に変異を導入したトランジェニックマウスを作製した。すなわち、CBFA1/PEBP2 α A の DNA 結合能を欠損させるために runt 領域のはじめの 41 アミノ酸をコードする DNA を含むエクソン 1 の 1.2kb を PGKneo ベクターで置換したトランジェニックマウスを作製した。その結果、CBFA1/PEBP2 α A 対立遺伝子の双方に変異を有するマウス (ホモ変異マウス、あるいはホモ結合体マウス) は、呼吸できずに出生直後に死んでしまった。それらのマウスの骨格系を調べてみると、驚くべきことに、骨形成の完全な欠損が起きていた。アルカリリフォスファターゼは弱く発現しているがオステオポンチンやオステオカルシンは発現していないような未熟な骨芽細胞、また、数は少ないが未分化な破骨細胞が軟骨膜には出現してくるものの、軟骨組織には血管も間葉系細胞も侵入していなかった。これらの結果により、ホモ変異マウスでは、骨芽細胞の分化成熟が阻害されることにより膜性骨化も内軟骨性骨化も完全に阻害されることが示唆され、今まで T リンパ球での機能しか示唆されていなかった CBFA1/PEBP2 α A が、骨形成において必須の役割を果たしていることが初めて明らかとなり、本発明を完成するに到った。

【0009】すなわち本発明の要旨は、(1) コア結合因子 / ポリオーマエンハンサー結合蛋白質 (CBFA1/PEBP2 α A) をコードする遺伝子に変異を導入させてなるトランジェニック動物、(2) CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子内の runt 領域 DNA に変異を導入させてなる前記 (1) 記載のトランジェニック動物、(3)

CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なくとも一部を欠損させる変異を導入させてなり、かつ、骨形成能が欠損した前記 (1) または (2) 記載のトランジェニック動物、(4) 骨芽細胞の分化成熟阻害が生じている前記 (1) ~ (3) いずれか記載のトランジェニック動物、(5) トランジェニック動物がホモ変異動物である前記 (1) ~ (4) いずれか記載のトランジェニック動物、(6) トランジェニック動物がヘテロ変異動物である前記 (1) または (2) 記載のトランジェニック動物、(7) 前記 (6) 記載のトランジェニック動物を交配させて得られる前記 (5) 記載のトランジェニック動物、(8) 動物がマウスである前記 (1) ~ (7) いずれか記載のトランジェニック動物、(9) 動物に CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の変異を導入することを特徴とする、骨形成能欠損トランジェニック動物の作製方法、(10) CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なくとも一部からなる骨形成用 DNA、に関する。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明のトランジェニック動物は、CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子に変異を導入

することにより得られるものである。

【0011】本発明において、遺伝子に変異を導入するとは、前記遺伝子の塩基配列の1以上の塩基に置換、欠失、挿入または付加の変異を導入することをいう。該変異により、前記遺伝子の少なくとも一部を欠損させる変異を導入させたトランスジェニック動物が好ましく、具体的には、CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子のエクソン1がコードするDNA結合領域であるrunt領域の一部、あるいは全部をコードするDNA部分を欠損させたものが一例として挙げられる。即ち、CBFA1/PEBP2 α A の最初のエクソンの一部または全部を欠損させたものである。

【0012】本発明のトランスジェニック動物は、前記遺伝子の欠損変異により、骨形成能が欠損したトランスジェニック動物が好ましい。骨形成能の欠損は、実施例に記載のように全身に及んでいる。該欠損の原因は、CBFA1/PEBP2 α A のDNA結合能の欠損により、骨芽細胞の分化成熟阻害が生じているためと考えられる。従つて、骨芽細胞の分化成熟阻害が生じているトランスジェニック動物が好適に使用される。

【0013】なお、本発明のトランスジェニック動物とは、前記遺伝子の変異が対立遺伝子の両方に導入されたホモ変異動物、前記遺伝子の変異が対立遺伝子の片方に導入されたヘテロ変異動物およびそれらの出生前の胎児も含まれる。該ホモ変異動物は、該ヘテロ変異動物を交配することにより、得られるものである。

【0014】本発明において、CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子とは、用いられる動物に応じて、内因性の遺伝子が選ばれる。

【0015】用いられる動物としては、ヒト以外の、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ等の実験動物等が挙げられるが、遺伝子工学的に利用が容易であるところから、マウスが好適である。

【0016】また、本発明は、動物にCBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の変異を導入することにより、骨形成能欠損トランスジェニック動物を作製する方法を提供する。用いられる方法としては、ジーンターゲティング等の公知の方法が挙げられる(MEDS iバイオ実験シリーズ ジーンターゲティング メディカル・サイエンス・インターナショナル発行(1995年))。マウスを用いたトランスジェニックマウスの具体的な作製方法は、実施例に記載されている。

【0017】前記により得られた本発明の好適なトランスジェニックマウスは、前記したように、全身的に骨形成能が欠損したものであり、そして骨芽細胞の分化成熟阻害が生じているものと判断される。従つて本発明のトランスジェニックマウスを用いてその組織あるいは遺伝子等の解析を行うことにより、骨形成、中でも骨芽細胞の分化におけるCBFA1/PEBP2 α A あるいはその標的遺伝子の役割の解明が進むことが考えられる。そしてこのような解明により、骨芽細胞の分化に対する作用を特徴と

する骨粗鬆症の治療法、あるいはその他の骨代謝異常症の治療法を確立する上で重要な情報が得られるものと期待される。さらに、本発明の好適なトランスジェニックマウスでは破骨細胞の分化にも異常が認められるため、本マウスを用いて破骨細胞の分化機構を解明することは、破骨細胞に対する作用を特徴とする骨粗鬆症の治療法あるいはその他の骨代謝異常症の治療法を確立する上でも極めて重要である。

【0018】このようにCBFA1/PEBP2 α A が骨形成において必須の役割を果たしているという本発明における知見から、換言すればCBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の全部又は一部からなるDNAは、骨形成に必須の役割を果たすDNA、即ち骨形成用DNAとして認識される。従つて、本発明は一面においてCBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なくとも一部からなるDNAを骨形成用DNAとして提供するものと言える。このような本発明の骨形成用DNAは、常法により遺伝子治療における有効成分として用いることができる。即ち、CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なくとも一部からなるDNAを遺伝子治療剤として使用することにより、細胞内でCBFA1/PEBP2 α A あるいはその一部分が高発現し、該細胞内において骨形成の行われることが期待される。従つて、本発明の骨形成用DNAは、骨粗鬆症、あるいはその他の骨代謝異常症に対する治療又は予防剤となる。

【0019】例えば、本発明の骨形成用DNAを遺伝子治療剤として細胞内に導入する方法としては、ウイルスベクターを利用した遺伝子導入方法、あるいは非ウイルス性の遺伝子導入方法(日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、実験医学増刊12(15)(1994)、実験医学別冊「遺伝子治療の基礎技術」、羊土社(1996))のいずれの方法も適用することができる。

【0020】ウイルスベクターによる遺伝子導入方法としては、例えばレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ヘルペスウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンビスウイルス等のDNAウイルス、又はRNAウイルスに、CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なくとも一部からなるDNAを組み込んで導入する方法が挙げられる。このうち、レトロウイルス、アデノウイルス、アデノ関連ウイルス、ワクシニアウイルスを用いた方法が、特に好ましい。非ウイルス性の遺伝子導入方法としては、発現プラスミドを直接筋肉内に投与する方法(DNAワクチン法)、リポソーム法、リポフェクチン法、マイクロインジェクション法、リン酸カルシウム法、エレクトロポレーション法等が挙げられ、特にDNAワクチン法、リポソーム法が好ましい。

【0021】また、本発明の骨形成用DNAを遺伝子治療剤として実際に作用させるには、DNAを直接体内に

導入する *in vivo* 法、およびヒトからある種の細胞（例えば、骨髄細胞など）を取り出し体外でDNAを該細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法があり（日経サイエンス、1994年4月号、20-45頁、月刊薬事、36(1)、23-48(1994)）、実験医学増刊、12(15)(1994)）、特に限定されないが、*in vivo* 法がより好ましい。

【0022】*in vivo* 法により投与される場合は、疾患、症状等に応じた適当な投与経路により投与され得る。例えば、静脈、動脈、皮下、皮内、筋肉内等に投与することができる。*in vivo* 法により投与する場合は、一般的には注射剤等とされ、必要に応じて慣用の担体を加えてもよい。また、リポソームまたは膜融合リポソーム（センダイウイルス（HVJ）—リポソーム等）の形態にした場合は、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等のリポソーム製剤とすることができます。

【0023】

【実施例】以下、本発明の一例として実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

【0024】実施例1

ターゲッティングベクターの構築

ラムダフィックス2ファージベクターの129/Svマウスゲノミックライブラリー（ストラタジーン社製）を、CBFA2/PEBP2 α B 遺伝子のrunt領域cDNAでスクリーニングした。制限酵素地図の作製及び塩基配列決定の後、CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子、CBFA2/PEBP2 α B 遺伝子、CBFA3/PEBP2 α C 遺伝子のrunt領域DNAを含むゲノム断片をそれぞれ得た。CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子の第一エクソンを含む断片を、CBFA1/PEBP2 α A の遺伝子破壊に用いた。ターゲッティングベクターを作製するために、2.3 kbのゲノムCla I - Bgl II断片を、Ssp I サイトにPGK-HSV-tk（以下、PGK-tk）を連結しているブルースクリプトSK（ストラタジーン社製）のCla I - Bam HIサイトにクローニングした。PGK-neoを含むEcoRI - Bgl II断片を平滑末端化して、やはり平滑末端化したXba I サイトに挿入した。最終的なターゲッティングベクターを得るために、1.3 kbのBstEII - Cla I ゲノム断片を平滑末端化して、平滑末端化されたNot I サイトに挿入し、続いて11.2 kbのSal I (Sal I はクローニングベクターのサイト) - Cla I ゲノム断片を、2.3 kbのゲノムCla I - Bgl II断片、PGK-tk、PGK-neoを含んでいるブルースクリプトSKのSal I - Cla I サイトに挿入した（図1）。

【0025】実施例2

トランスジェニックマウスの作製

ES細胞の培養・選択およびターゲッティングされたクローニングのスクリーニングは公知の方法で行った（Science 261, 1171-1174(1993)）。すなわち、ES細胞（E14, 2x10⁷）にSal I で直鎖状にしたターゲッティングベクター（1

6 μ g）をトランスフェクトし、G418(0.4mg/ml)とganc (gancyclovir, 2 μ M)で選択した。薬剤選択されたクローニングからゲノムDNAを抽出した後、ターゲットとする構築物に含まれる3'側領域であるCla I- Sal I (Sal I はクローニングベクターのサイト) 断片をプローブとして用い、BamHI 切断したゲノムDNAのサザンプロット分析によりクローニングをスクリーニングした。ターゲッティングされたESクローニングはC57BL/6J（日本クレア）から取り出した胚盤胞にインジェクションされ、ICR（日本クレア）メスを常法（MEDS iバイオ実験シリーズジーンターゲッティング メディカル・サイエンス・インターナショナル発行（1995年））により偽妊娠させた後、その子宮に移された。発生したキメラマウスはC57BL/6Jに戻し交配して、尾のDNAのサザンプロットによりヘテロ変異マウスを確認した。得られたヘテロ変異マウスを近親交配することにより、ホモ変異マウスを作製した。

【0026】実施例3

胎児DNAのサザンプロット分析

20 野生型（以下、WT）（+/+）マウス、ヘテロ変異（+/-）マウス及びホモ変異（-/-）マウスのd18.5（胎生18.5日、以下同様）胎児の肝臓よりゲノムDNAを単離し、Bam HIで切断した後電気泳動に付し、実施例2に記載のClaI-SalIプローブを用いてサザンプロット分析を行なった（図2）。

【0027】実施例4

胎児におけるCBFA1/PEBP2 α A のrunt領域DNAのRT-PCR分析

WT（+/+）マウス、ヘテロ変異（+/-）マウス及びホモ変異（-/-）マウスのd18.5 胎児の肝臓より抽出した全RNAを使用し、CBFA1/PEBP2 α A のrunt領域DNAのRT-PCR分析を行なった（図3）。

【0028】実施例5

エックス線検査

軟エックス線（SR0-M50、ソフロン社製）により、WTマウス及びホモ変異マウスのX線写真を撮影した（図4）。

【0029】実施例6

骨格サンプル調製

40 d 15.5から d 18.5の胎児及び新生児の内臓を摘出して100%エタノールで4日間固定した後、アセトンに移した。3日後に水でリーンスして、等容量の95%エタノールに溶解した0.1%アリザリンレッドS（シグマ社製）、等容量の70%エタノールに溶解した0.3%アルシアンブルー8GX（シグマ社製）、等容量の100%酢酸及び17倍容量エタノールからなる染色液で、10日間染色した。96%エタノールでリーンスした後、標本を20%グリセロール-1%水酸化カリウム液中に37°C、16時間置き、その後室温で骨格が明らかに見えるようになるまで置いた（図5）。保存用には、標本を50%、80%グリセロール

に順次移していく、最後に100%グリセロールに移した。

【0030】実施例7

組織学的評価

d 18.5の胎児を、PBSに溶解した10%中性ホルマリン緩衝液で20時間処理することにより固定した。頭部と下肢を胎児から分離し、PBSで洗浄した。アルコール系列で脱水してテクノビット8100（ヘラウスクルツァー社製）に包埋した。未脱灰の4μm厚切片を作製し、ヘマトキシリンエオジン染色、アルカリホスファターゼ（以下、ALP）染色、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ（以下、TRAP）染色、あるいはフォンコッサ染色を行った。切片上でのALP活性の検出は、0.1mg/mlナフトールAS-MXホスフェート（シグマ社製）、0.5%N,N-ジメチルホルムアミド、2mM塩化マグネシウム、0.6mg/ml

ファストブルー塩（シグマ社製）を含む0.1Mトリス塩酸溶液（pH.8.5）で30分室温で処理することにより行った。TRAP活性は、0.1mg/mlナフトールAS-MXホスフェート（シグマ社製）、0.5%N,N-ジメチルホルムアミド、0.6mg/mlファストレッドAL塩（シグマ社製）を含む0.1M酢酸緩衝液（pH.5.0）で30分間37°Cで処理することにより行った（図6）。

【0031】実施例8

In situ ハイブリダイゼーション

ジゴキシゲニン-11-UTPで標識された一本鎖RNAプローブは、DIG RNA 標識キット（ベーリンガーマンハイム社製）を用い、キットに添付されているプロトコールに従って調製した。1.0kbのマウスオステオネクチン（以下、OSN）cDNA断片、1.2kbのマウスオステオポンチン（以下、OSP）cDNA断片、0.47kbのマウスオステオカルシン（以下、OSC）cDNA断片（Cell Tissue Res. 277, 27-32(1994)）、そして0.5kbのマウスマトリックスグラタンパク質（以下、MGP）cDNA断片（Acta Histochem. Cytochem. 26, 303-309(1993)）を、それぞれアンチセンス鎖及びセンス鎖のプローブを作製するのに用いた。ハイブリダイゼーションは公知の方法で行った（Acta Histochem. Cytochem. 26, 303-309(1993)）（図7）。

* 【0032】実施例9

頭蓋骨由来細胞の分離と培養

WTマウスの頭蓋骨とホモ変異マウスの頭蓋骨部分にあたる纖維状の組織を、それぞれd 18.5の胎児から分離した。これらを約2mm四方の大きさに小さく切り、3次元コラーゲンゲル（セルマトリックス；ニッタゼラチン社製）中で10-14日間、10%FBSを含むα-MEM培地で培養した。植えて増殖してきた細胞を、0.2%コラゲナーゼ（和光純薬社製）を含むPBS（-）溶液で30分間37°Cで処理して回収した。WTマウス及びホモ変異マウス由来の細胞は、それぞれ別個に10%FBSを含むα-MEM培地中で培養した。サブコンフルエンスに達した後、培養フラスコからはがして 1×10^4 cells/cm² の細胞密度でマルチウェルプレートに播きこんだ。それらは、様々な濃度のrhBMP-2と共に培養した。該rhBMP-2はCHO細胞にて產生させたもので、公知の方法により精製した（Science 242, 1528-1534 (1988)）。rhBMP-2は山之内製薬株式会社より供与された。以下に記載の全ての実験には2継代あるいは3継代の細胞を用いた。

【0033】実施例10

ノーザンプロット分析及びRT-PCR

塩化リチウム法によりd 18.5胎児の骨・皮膚・頭蓋骨由来細胞から全RNAを調製し、ナイロン膜にRNAを転写して、³²Pで標識した0.78kbのラットALP cDNA断片（J. Bone Miner. Res. 2, 161-164(1987)）、1.2kbのマウスOSP cDNA断片及び0.47kbのマウスOSC cDNA断片（Cell Tissue Res. 277, 27-32(1994)）とハイブリダイズさせることによりノーザンプロット分析を行った（図8）。

【0034】RT-PCRは、M-MuLV逆転写酵素（ギブコBRL社製）とランダムヘキサマーを用いてcDNAを作製し、該cDNAのPCRを50μlの系で、アンプリタックDNAポリメラーゼ（パーキンエルマー社製）を用いて行った。用いたプライマーのリストを表1に示す。

【0035】

【表1】

遺伝子	プライマー配列	配列番号
CBFA1/PEBP2 α A	5'-CCGCACCAACCCACCAT-3' 5'-CGCTCCGCCACAAATCTC-3'	1 2
	5'-GAACCCCATTCCTGTCGG-3' 5'-TCACAAGGCACTGACCCCT-3'	3 4
TGF- β 1	5'-GTTGGAAACGGCTTGCAATT-3' 5'-GCGCTATAACTGATCCATGT-3'	5 6
	5'-CGTTCAATGTCCTCAGTG-3' 5'-GGTCATCTTCATTGTCACCTC-3'	7 8
TGF- β 2	5'-AGGAAATTCACTGTTCTGCCACCTCT-3' 5'-CCTCTGAATCAAAGGGCGATCTA-3'	9 10
	5'-TGAACCTGGCTGGCCCTGTGG-3' 5'-CTATGCCAATCCCCAGGGAGG-3'	11 12
BMP-2	5'-TGTACCCAGGGCACTGAGGC-3' 5'-GGTGTCTCCCTGTGTGGC-3'	13 14
	5'-GGCCGCTCATTCGGGATTAC-3' 5'-CATTGTGATGGCACTGCTG-3'	15 16
BMP-4	5'-GGCCGCTCACACTCCTTGAAAC-3' 5'-GTCCATCCGAGTCACCCACA-3'	17 18
	5'-CCGATGGCTGGTTGTGTCAT-3' 5'-GCACAGACCACACGACCCAGA-3'	19 20
BMP 受容体 IA型	5'-GCCCTTGCTTATCTCTGCA-3' 5'-CTATTCAGCTCTCGTCAG-3'	21 22
	5'-AGATGAGAAGGCCAACGTCAC-3' 5'-CGTACCATCTCCACCTCTG-3'	23 24
BMP 受容体 II型	5'-AATCAAGAACGGCTGTGTGCA-3' 5'-CATGCTGTGAAGACCCCTGTT-3'	25 26
	5'-GGACCAAGAGACCCCTTGGGGG-3' 5'-GGCTGCTTTCTACGGCTTCAGTCG-3'	27 28
IGF-1	5'-CGCCCCAGCGAGACTCTGTGC-3' 5'-GCCACGGGTATCTGGGAA-3'	29 30
	5'-ATGCTGTTGAAGTCGAGCCATGTGCTGG-3' 5'-CCGGCTGGAGCTTGGGGCCCCGTTCAT-3'	31 32
IGF-2	5'-TCTACACTCTTCTGCGCA-3' 5'-ACAGATCTTGATGTAGAAAGACAGG-3'	33 34
	5'-CTATACTGGCAGTCCACCTGTCTG-3' 5'-AGTGAGGATTTTGACCCAGGAAGCAA-3'	35 36

【0036】PCRはジーンアンプ2400(パーキンエルマー社製)を用いて、94°C30秒・50-63°C30秒・72°C30-45秒のサイクルを30回行った(図9)。

【0037】実施例11

ALP活性とOSC産生量の測定

培養細胞は、0.1%トライトンX-100を含む0.1Mトリス緩衝液(pH7.2)中で超音波破碎した。ALP活性は、パラーニトロフェニルホスフェートを基質として0.05M 2-アミノ-2-メチルプロパノール、2mM塩化マグネシウム(pH10.5)溶液中で測定した。410 nmの吸光度を測定することで、パラーニトロフェノール放出量を測定した。タンパク濃度はBCAタンパクアッセイキット(ピアスケミカル社製)を用いて測定した。最後の3日間に培地中に分泌されたOSC量は、マウスOSCアッセイキット(バイオメデカルテクノロジー社製)を用いて、RIAで定量した(図10)。

【0038】実施例12

血液学的解析

末梢血のサイトスピニンサンプル及び肝臓の塗末標本は、メイーグルンワルドーギムザで染色した。有核細胞数はツエルク液で末梢血を20倍希釈して計測した。赤血球数

は、PBSで末梢血を400倍希釈して測定した。ヘモグロビンは、ヘモグロビンアッセイキット(和光純薬社製)を用いプロトコールに従って評価した。

【0039】実施例13

フローサイトメトリー解析

胸腺・肝臓・脾臓から、4%FCS含有PBSを用いて単一細胞懸濁液を調製した。これらの懸濁液は、染色前に、0.14M塩化アンモニウムを含む17mMトリス(pH7.3)液で処理をして赤血球を除いている。細胞(5x10⁶)を以下に示す標識抗体(ファーミンジョン社製)と混合した。フルオロセイン(FITC)標識-53-6.7(抗CD8)、フィコエリスリン(PE)標識-RM4-5(抗CD4)、FITC標識-H57-597(抗 α β)、PE標識-GL3(抗 γ δ)、FITC標識-R6-60.2(抗IgM)、PE標識-RA3-6B2(抗B220)、FITC標識-RB6-8C5(抗Gr-1)、PE標識-M1/70(抗Mac1)。解析はファクスキャン(ベクトンディッキンソン社製)により行った(図11)。死細胞はヨウ化プロピデウム染色により除き、10000個の生細胞を解析した。

【0040】結果1. CBFA1/PEBP2 α A欠損マウスは出生後すぐに死亡する

CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子を破壊するために、runt領域のはじめの41アミノ酸をコードするDNAを含むエクソン1の1.2kbをPGK-neoベクターで置換し、ターゲッティングベクターを作製した(図1)。このターゲッティングベクターをE14ラインのES細胞に電気的に導入し、G418とgancで選択した。ターゲットされたES細胞をC57BL/6マウスの胚盤胞に注入し、その結果作製されたキメラマウスをC57BL/6マウスと交配し、CBFA1/PEBP2 α Aの欠損を生殖系列にトランスマウスとした。相同遺伝子の一方が破壊されたヘテロ変異マウス(CBFA1/PEBP2 α A+/-)は、全体的な外観は通常のマウスとほとんど変わらなかった。加えて、4週令ではWTマウスと体重にも有意な差はなく(雄:+/-は18.6±3.4g、+/*は20.8±2.6g、雌:+/-は16.7±2.9g、+/*は17.0±2.7g)また、生殖できる個体であった。ヘテロ変異マウスを掛け合わせても、4週令の遺伝子系の解析で、ホモ変異マウス(CBFA1/PEBP2 α A-/-)を検出しなかった。

【0041】

【表2】

ステージ	数	遺伝子型		
		+/*	+/-	-/-
4週齢	108	25	83	0
新生	12	2	6	4*
d18.5	221	58	99	64
d17.5	15	2	7	6
d16.5	49	9	25	15

a:出生直後に死亡した新生児の数

【0042】表2より、ヘテロ変異マウスを掛け合わせた場合、常に新生児が2.3匹死んでいたが、その遺伝子系は常にCBFA1/PEBP2 α A-/-であった。しかし、胎生18.5日(d18.5)においては、メンデルの法則で予想される頻度で生きたホモ変異マウスの胎児を認めた(表2及び図2)。ヘテロ変異マウスを掛け合わせると出産は行われるが、通常より小さな新生児がほとんど呼吸することなくすぐに死んでいくことが明らかになった。それらはすべてホモ変異マウスであった。また、ホモ変異マウスをつづいてやると2ないし3分間は反応することから出産直後は生存していることを確認したが、すぐに呼吸不全を起こした。ホモ変異マウスの胎児のd18.5時の体重は、ヘテロ変異マウスおよびWTマウスの胎児の約80%であり(+/*; 1.16±0.21g, +/-; 1.17±0.14g, -/-; 0.93±0.22g)、四肢が短かった。

【0043】CBFA1/PEBP2 α A 遺伝子が破壊されていることを確認するために、本発明者はrunt領域部分のRT-PCRを行った(図3)。ホモ変異マウスの胎児では、runt領域部分のcDNAは増幅されなかった。runt領域部分は、DNA結合及びCBFB/PEBP2 β とのヘテロ2量体

形成の両方に必須であるので、ホモ変異マウスの胎児ではCBFA1/PEBP2 α Aの機能は確実に損なわれている。

【0044】結果2. CBFA1/PEBP2 α A ホモ変異(-/-)マウスでは骨化が起こらない

ホモ変異マウス(CBFA1/PEBP2 α A-/-)の胎児および新生児では、全体的に矮小化を示し、四肢が短い。そこで軟X線及びアリザリンレッド/アルシアンブルーの2重染色で、骨格系の発達を調べた(図4及び図5)。アリザリンレッドは石灰化した骨を染め、アルシアンブルーは軟骨を染めるものである。WTマウスd18.5胎児を軟X線で調べると、頭蓋骨/頸/上肢・下肢/肋骨/脊椎を含む様々な骨格成分で石灰化が見られた。一方、d18.5のホモ変異マウスでは、脛骨/とう骨/脊椎の一部は弱く石灰化しているものの、頭蓋骨/頸/上腕骨/大腿骨では全く石灰化が見られなかった(図4)。さらに、WTマウスの胎児では充分に石灰化された骨格が見られるのに、d15.5-16.5のホモ変異マウスでは全身にわたって石灰化がないことが、アリザリンレッド染色で示された。WTマウスではd15.5から出生にかけてアリザリンレッド染色で染められる石灰化部分が増大した。

それに対してd17.5からd18.5のホモ変異マウス胎児・新生児では、脛骨/腓骨/とう骨/尺骨において、また脊椎背側の弓形部分・肋骨の背側にピンポイントで、アリザリンレッドでの弱い染色が見られるに過ぎない。また一方、ホモ変異マウスにおける軟骨の発達は、アルシアンブルー染色で見るかぎりは正常のように見えた。ヘテロ変異マウス(CBFA1/PEBP2 α A+/-)胎児・新生児では、骨格の発達には明らかな異常は認められなかった(図5)。さらに本発明者は、CBFA1/PEBP2 α AとCBFB/PEBP2 β のヘテロ変異マウスを掛け合わせ、CBFA1/PEBP2 α A+/-:CBFB/PEBP2 β +/-という子供を得た。アリザリンレッド/アルシアンブルー染色からは、この掛け合わせたマウスは正常な骨格形成を示した。

【0045】d18.5の胎児の骨格の組織切片を、ALP、フォンコッサ及びTRAPで染色して調べた(図6)。ALPは骨芽細胞を、フォンコッサは石灰化組織を、またTRAPは破骨細胞を染めるものである。d18.5のWTマウス胎児は、脛骨は3つの部分からなる。すなわち2つの骨端の軟骨部分(近位・遠位)と、軟骨部分に挟まれる部分の骨化した骨幹である(図6A)。骨幹部では、皮質骨と骨幹でよく石灰化が進んだ骨組織が観察される(図6C)。これらの石灰化した骨の周りには、数多くのALP陽性骨芽細胞が存在している(図6E)。TRAP陽性の破骨細胞は、多くは石灰化した骨・軟骨の周辺に散在している(図6G)。骨幹部の中央には大きな骨髓腔が形成されている(図6A)。d18.5のホモ変異マウスの胎児では、脛骨の中程は骨髓腔を形成せず石灰化した軟骨のままであった(図6B及び図6D)。血管も間葉系細胞も両方とも石灰化軟骨には侵入しない様子が観察され

た。石灰化軟骨の軟骨膜部分にはALP陽性細胞が出現し

15

ているものの、骨形成は全くされなかつた（図6 D及び図6 F）。TRAP陽性細胞は数少ないが、石灰化軟骨の軟骨膜部分に出現していた（図6 H）。しかし細胞の大きさと核の数は、WTマウス胎児に比べて少なかつた（図6 J及び図6 I）。ホモ変異マウスの大腿骨は石灰化していない軟骨でできており、ALP陽性細胞もTRAP陽性細胞も、大腿骨の軟骨膜には出現していなかつた。d 18.5のWTマウス胎児では、脳とその皮下の結合組織の間で良好に石灰化の進んだ骨が形成される（図6 K）。骨の表面は数多くのALP陽性骨芽細胞でおおわれる（図6 M）。骨膜にはTRAP陽性破骨細胞もいくつか認められる。それに対し、d 18.5のホモ変異マウスの胎児では、脳とその皮下の結合組織の間にはただ薄い纖維状の結合組織が観察されるに過ぎなかつた（図6 L）。ALP陽性細胞は、纖維性の結合組織に認められるが、石灰化した骨は全く認められなかつた（図6 N）。ホモ変異マウスの頭蓋骨部分にはTRAP陽性細胞は認められなかつた。

【0046】結果3. 骨芽細胞におけるCBFA1/PEBP2 α Aの優先的発現

CBFA1/PEBP2 α Aの発現を調べるため、d 18.5のWTマウス胎児の切片をCBFA1/PEBP2 α AのRNAプローブでハイブリダイズしたところ、骨格系でポジティブなシグナルが検出された。このようなCBFA1/PEBP2 α Aの骨格系での発現は、今まで報告されていなかつたことである。骨では、軟骨細胞より骨芽細胞の方が強く発現している一方、破骨細胞には明らかな発現は認められなかつた。胸腺にはこれまでの知見通り（Mol. Cell. Biol. 15, 1 662-1670 (1995)）、CBFA1/PEBP2 α Aが発現していたが、ホモ変異マウスの胸腺は組織学的にはなんら異常を認めなかつた。CBFA1/PEBP2 α Aは、腱にも発現し真皮にも弱く発現しているが、組織学的には、腱はWTマウスとホモ変異マウスで違いを認めなかつた。真皮においては、CBFA1/PEBP2 α Aは線維芽細胞に発現していた。ホモ変異マウス胎児の真皮の線維芽細胞は、WTマウス胎児にくらべてやや数が少ないようみえるが、厚さはほぼ同じであった。胎盤ではCBFA1/PEBP2 α Aの明らかな発現は検出されなかつたが、ホモ変異マウスでは胎盤の血管壁にミネラルの凝集が認められたこと、血管が拡張していたことが観察された。肝臓におけるCBFA1/PEBP2 α AのmRNAは、RT-PCRにより観察されたが（図3）、d 18.5のWTマウス胎児の脳・心臓・肺・腸・肝臓・筋肉などの臓器では、in situハイブリダイゼーションによるCBFA1/PEBP2 α Aの発現は観察されなかつたし、ホモ変異マウスではこれらの組織に異常は認められなかつた。

【0047】結果4. 非コラーゲン性骨基質タンパクの発現

非コラーゲン性骨基質タンパクであるOSNは、初期の骨芽前駆細胞から骨細胞まで発現している。また骨芽細胞の分化においては、ALPの発現が、そしてOSPの発現が

16

起こり、その後にOSCの発現が起こることが知られている。また軟骨細胞の分化マーカーとしてMGPが知られている。本発明者は、そのうちOSN、OSP、OSC及びMGPのRNAをプローブに用い、コントロール（+/-）及びホモ変異マウス（-/-）のd 18.5胎児の切片とのin situハイブリダイゼーションを行うことにより、これら胎児の骨芽細胞及び軟骨細胞の分化成熟ステージを決定する実験を行つた（図7）。コントロールの骨芽細胞には、OSN、OSP、OSCのRNAがハイブリダイズした（図7 C、7 E、7 G）。しかしホモ変異マウスでは、骨芽細胞は扁平で、軟骨膜周辺にみられるのみであり、それらはOSNではハイブリダイズするものの（図7 D）、OSPでは非常に弱く、OSCでは全くハイブリダイズしなかつた（図7 F、7 H）。コントロール及びホモ変異マウス胎児の軟骨細胞は、共にOSN、MGPで染まった（図7 C、7 D、7 I、7 J）。しかし肥大軟骨は、ホモ変異マウスでは、からうじて検出できる程度にしかOSPを発現していなかつた。それに対し、コントロール胎児ではもっと強く発現していた（図7 F、図7 E）。

【0048】結果5. 骨形成に関連する遺伝子の発現

ALP、OSP、OSCの発現を、骨のRNAを用いたノーザンプロット分析により調べた（図8）。WTマウス胎児では3つ全てが発現しているが、ホモ変異マウスはALPは弱く発現しているものの、OSPはからうじて検出できる程度、またOSCは全く検出されなかつた。これらは、in situハイブリダイゼーションの結果と一致していた（図7）。次に、骨形成に関与していると言われている因子の遺伝子の発現を調べた。すなわちTGF- β スーパーファミリーとその受容体遺伝子、すなわちTGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-4、BMP-6、TGF- β 1型受容体、TGF- β 2型受容体、BMP受容体IA型（ALK3）、BMP受容体IB型（ALK6）、アクチビン受容体I型（ALK2）、BMP受容体II型の遺伝子発現について、d 18.5胎児の骨・皮膚・頭蓋骨由来細胞のRNAを用いてRT-PCRにて検討した（図9）。上記のいずれの遺伝子も、骨・皮膚・頭蓋骨由来細胞いずれにおいても、ホモ変異マウスはWTマウスと同様に発現していた。さらに、IGF-1、IGF-2、I型IGF受容体、II型IGF受容体についても、骨・皮膚・頭蓋骨由来細胞いずれにおいてもホモ変異マウスとWTマウスで同様な発現が認められた。

【0049】結果6. in vitroでの骨芽細胞の分化

d 18.5 WTマウス胎児とホモ変異マウス胎児から分離した頭蓋骨由来細胞において、ALP活性とOSC産生に対する組み換えヒトBMP2（rhBMP-2）の効果を検討した（図10）。rhBMP-2存在下で3日間培養すると、WTマウス胎児でもホモ変異マウス胎児でもALP活性は上昇するが、ホモ変異マウス胎児のほうではWTマウスの約1/3の活性であった（図10 A）。さらに3日間rhBMP-2存在下で培養し続けると、ホモ変異マウスでもWTマ

ウスの半分をこえるところまで活性が上昇してきた(図10B)。rhBMP-2処理3日間では、ホモ、WTマウス双方ともOSC産生は上昇してこないが、さらに3日間rhBMP-2処理を続けると、両方でOSC産生は上昇してきた。しかし、ホモ変異マウスではWTマウスの約1/3しか产生されなかった(図10C)。ALP、OSC遺伝子発現の上昇は、RT-PCRでも確認した。

【0050】結果7. 骨髄の欠損による髄外造血
d18.5のホモ変異マウス胎児は少し貧血ぎみであり、末梢血中に通常の10倍多い有核細胞が存在していた(表3)。末梢血塗抹標本を調べると、有核細胞の多くは成熟した赤芽球であり、若干の好中球が混ざっていた。ホモ変異マウス胎児の脾臓細胞の数は、WTマウス、ヘテロ変異マウス胎児に比べて有意に多かった(表3)。ホモ変異マウス胎児の肝臓における細胞数は、WTマウス、ヘテロ変異マウス胎児に比べて有意に少なかったが*

* (表3)、ホモ変異マウス胎児の肝臓の標本は、骨髓球系列の細胞の増加を示していた。これらの結果は、ホモ変異マウス胎児の肝臓と脾臓のFACS解析によっても確認され、Gr-1陽性の顆粒球が比較的増加していた(図11)。これらの結果は、ホモ変異マウス胎児における骨髓の欠損が引き起こす髄外造血に一致した結果であった。CBFA1/PEBP2 α Aは胸腺にも発現しているが、 α β T細胞と γ δ T細胞は胸腺では正常に分化しているようである(図11)。しかし、胸腺細胞の数は、ホモ変異マウスではWTマウス、ヘテロ変異マウスに比べて明らかに少なかった(表3)。その上、ホモ変異マウスでは、B細胞のIgM陽性細胞への分化成熟が、胎児肝と脾臓で見られた(図11)。

【0051】

【表3】

	末梢血			細胞の総数*		
	有核細胞 (μ l)	RBC ($\times 10^6$ / μ l)	Hb (g/dl)	胸腺 ($\times 10^6$)	肝臓 ($\times 10^6$)	脾臓 ($\times 10^6$)
+/+	2362 \pm 1525 n=17	283 \pm 74 n=17	12.3 \pm 2.1 n=12	3.44 \pm 1.25 n=5	29.9 \pm 10.7 n=19	0.52 \pm 0.22 n=8
+/-	2147 \pm 1270 n=16	278 \pm 56 n=16	12.7 \pm 2.7 n=12	3.08 \pm 1.29 n=14	37.3 \pm 14.2 n=30	0.68 \pm 0.58 n=17
-/-	20943 \pm 10825 ^b n=19	231 \pm 58 ^c n=19	10.6 \pm 2.6 ^d n=15	2.01 \pm 0.93 ^e n=14	20.0 \pm 9.2 ^f n=20	1.23 \pm 0.62 ^e n=11

a: 有核細胞を計数した。

b~g: +/−マウスと比較して、平均の比較のためのone-way t検定の確率(p)。

^bp=10⁻⁶, ^cp=0.01, ^dp=0.02, ^ep=0.01, ^fp=10⁻⁶, ^gp=0.01。

【0052】考察

以上の結果につき総括する。CBFA1/PEBP2 α A-/−マウスの新生児は呼吸できずに死んでしまった。グルコースを注入しても効果がなく、肺のサーファクタントタンパクの発現も正常であった。肋骨の骨化がないことが、呼吸できない一番大きな原因であり、そのため、死ぬものと考えられる。肺の拡張に必要な陰圧を十分に達成できるだけの強さが、骨化していない肋骨にはないためと考えられる。

【0053】CBFA1/PEBP2 α A-/−胎児は骨形成の完全な欠損が認められたため、本発明者らは骨芽細胞の分化成熟段階を調べるために、OSN、ALP、OSP、OSCの遺伝子発現を検討した。OSNは分泌性のタンパクであり、リソ酸化されるし、1型コラーゲンに結合するカルシウム結合性糖タンパクである。そして、初期の骨芽前駆細胞から骨細胞まで発現が検出される(J. Bone Miner. Res. 7, 743-754(1992)、J. Bone Miner. Res. 9, 1551-1557(1994))。OSPはシアル酸リッチなリソ酸化糖タンパクである。OSCは、カルシウム結合性のタンパク質であるが、

骨Glaタンパク質(BGP)としても知られており、ハイドロキシアパタイトに結合することのできるビタミンK依存性タンパクである。骨芽細胞の分化においては、ALPの発現が、そしてOSPの発現が起こり、その後にOSCの発現が起こることが知られている。

【0054】ホモ変異マウスの骨芽細胞では、OSNは発現しているものの、ALP発現は低く、OSPとOSCはかろうじて発現が検出される程度であった(図6、図7、図8)。これらのデータにより、CBFA1/PEBP2 α A-/−胎児においては骨芽細胞の分化の初期の段階で、その分化成熟の阻害が起こっていることが示された。

【0055】OSCは、プロモーター領域に3つのCBF/PEBP2サイトがあり、そこにCBF/PEBP2関連因子が結合する(J. Biol. Chem. 270, 30973-30979(1995)、Biochemistry 34, 13125-13132(1995)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 4968-4973(1996))、おそらく該OSCはCBFA1/PEBP2 α Aの標的遺伝子の一つであると考えられる。CBFA1/PEBP2 α A-/−の胎児から分離され、rhBMP-2存在下で培養した頭蓋骨由来細胞は、WTマウス胎児のそれと比較し

てOSCをあまり産生しなかった(図10)。しかし高濃度のrhBMP-2存在下で、ホモ変異マウスの胎児由来の細胞においてもOSCの産生量の増大が観察された。従って、少なくともin vitroでは、CBFA1/PEBP2 α A以外の転写因子が、BMP-2により誘導されたOSCの産生において重要な役割を果たしていることが示唆される。実際に、OSCの発現が下がったことがホモ変異マウスの完全な骨形成欠損の説明にはならない。なぜならば、OSC遺伝子のノックアウトマウスは骨形成の上昇が示されているからである(Nature 382, 448-452(1996))。

【0056】本発明者らはまた、骨形成に関係する遺伝子の発現を調べた。TGF β ファミリーに属する遺伝子(TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、BMP-2、BMP-4、BMP-6)とその受容体(TGF- β I型受容体、TGF- β II型受容体、BMP受容体IA型、BMP受容体IB型、アクチビン受容体I型、BMP受容体II型)、IGFs及びその受容体は、WTマウス・ホモ変異マウス両方の骨、皮膚及び頭蓋骨由来細胞で発現していた(図9)。従って、これらの遺伝子発現を制御できないことが、ホモ変異マウスの骨形成欠損の説明になるとは思えない。しかし、これらの遺伝子の微妙な発現の違いを検出するのはむずかしい。というのは、発現のレベルは骨芽細胞の分化段階によって違ってくるし(Mol. Cell. Biol. 15, 3273-3281(1995))、さらに、ホモ変異マウスでは骨芽細胞の分化がブロックされているため、WTマウスとホモ変異マウスの胎児で同じ細胞集団で比較することが不可能であるからである。従って、これらの遺伝子のうちの一部が骨芽細胞の分化の阻害に重要である可能性を排除することはできない。

【0057】OSN、MGP、OSPの発現も、軟骨細胞の分化マーカーとして調べた。OSNもまた、軟骨細胞で発現している(J. Cell. Biol. 106, 441-450(1988)、J. Anat. 162, 43-51(1989)、Histochem. J. 23, 281-289(1991))。MGPはGlaをふくむ、ビタミンK依存性のタンパクであり、胎児・成体の骨において軟骨細胞で発現が見られる(J. Biol. Chem. 263, 5820-5824(1988)、J. Histochem. Cytochem. 40, 1079-1088(1992))。OSPは、骨芽細胞だけでなく肥大軟骨細胞でも発現が検出される(J. Cell. Biol. 106, 441-450(1988)、Differentiation 37, 123-136(1988))。ホモ変異・WTマウス胎児の軟骨細胞は、OSN、MGPは両方とも発現していた(図7)。しかし、WTマウス胎児とは違って、ホモ変異マウスの胎児の肥大軟骨細胞では明らかなOSPの発現は認められなかった(図7F)。さらに、肥大軟骨細胞が最終分化したところで通常見られる石灰化が、ホモ変異マウスの胎児では限られた軟骨でしか観察されなかった(図5、図6)。これらのデータは、軟骨の最終分化も、ホモ変異マウスでは損なわれていることを示唆している。

【0058】ホモ変異マウスでは、石灰化した軟骨周辺に少数の破骨細胞が観察される。しかし、大きさは小さくて単核であることから、分化成熟していないことが示

される(図6H及びJ)。CBFA1/PEBP2 α Aは破骨細胞では発現を検出できなかったので、破骨細胞の分化阻害の原因が、破骨細胞自身にあるのか否かは明らかではない。破骨細胞の前駆細胞が、骨髓ストローマ細胞を含む骨形成細胞とコンタクトすることが、破骨細胞の分化に必要であることが示されている(Endocrinology 123, 2600-2602(1988)、J. Exp. Med. 173, 1291-1294(1991))。破骨細胞の分化が阻害されていることの主たる原因是、骨芽細胞の分化成熟阻害にあると考えることができるが、その証明にはさらなる研究を要すると思われる。

【0059】哺乳類での長骨の発生の間には、骨髓が形成される前に石灰化した軟骨の周りに骨膜下骨が形成される。その後、骨形成性細胞と毛細血管が骨膜付近から石灰化軟骨へと侵入し、内軟骨性の骨と骨髓腔が形成される。しかし、ホモ変異マウスの場合には、脛骨およびとう骨の石灰化軟骨の周囲では骨膜下骨は全く形成されなかった。ホモ変異マウス胎児のこの場所での骨形成不全は、引き続いて起こるはずの内軟骨性骨化と骨髓形成が起こらないというこの原因であると考えられる。あるいは、軟骨の分化が充分進まないことが、骨芽細胞・破骨細胞の分化に影響を与えていると考えられる。ホモ変異マウス胎児の肥大軟骨におけるOSP遺伝子発現の低下は、骨芽細胞と破骨細胞が軟骨に侵入することができない理由のひとつであると考えられる。というのは、OSPは、5'一発現調節領域にCBF/PEBP2結合推定サイトを持つし(J. Biol. Chem. 265, 14432-14438(1990))、細胞外マトリックスへの骨芽細胞・破骨細胞の接着を促進する働きを持つと考えられているからである

(J. Bone Miner. Res. 2, 259-265(1987)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4473-4475(1990)、J. Biol. Chem. 266, 20369-20374(1991))。内軟骨性骨化に対して膜性骨化の場合は、軟骨形成を経ずに直接骨が形成される。ホモ変異マウス胎児の頭蓋骨においては、骨芽細胞の分化・成熟阻害を伴う膜性骨化の完全なブロックが起こっている。以上の結果は、骨芽細胞の分化・成熟阻害が、骨形成の完全な阻害のもっとも重要な原因の一つであることを示している。

【0060】ホモ変異マウス胎児では、胎児発生段階における最終的な造血器官である骨髓が全く形成されなかった。肝臓と脾臓における顆粒球数の増加は、髓外造血の症状と一致している。なぜなら、マウス胎児においては骨髓造血は顆粒球形成に限られるからである(Blood Cells 1, 269-281(1991))。ホモ変異マウス胎児において末梢血の赤芽球数が増加している理由は今後明らかにする必要がある。しかし、貧血は、おそらく肝臓と脾臓での顆粒球形成過剰によると思われるが、末梢血での赤芽球数の増加の原因の一つであろうし、顆粒球形成過剰それ自体も赤芽球の分化・成熟やあるいは肝臓と脾臓からの移動に影響を与えているであろう。

【0061】結論として本発明者らは、CBFA1/PEBP2 α

A が骨形成、特に骨芽細胞の分化に必須であることを示した。しかしながら、骨芽細胞と破骨細胞の分化がブロックされるメカニズムについてはさらに検討が必要である。軟骨への血管侵入の必要性も調べる必要がある。そして最も重要なことは、CBFA1/PEBP2 α A によって調節される標的遺伝子の同定である。CBFA1/PEBP2 α A は骨形成におけるマスタージーンの一つであろうし、OSP、OSC、そしてそのほか未知の遺伝子の発現調節をすると考えられる。トランスジェニックマウスの更なる解析がこれらのことを見明らかにするであろう。

【0062】本発明は、CBFA1/PEBP2 α A が骨形成に必須の因子であることを初めて明らかにしたものである。従って、本発明のトランスジェニック動物を用いてその組織あるいは遺伝子等の解析を行うことにより、骨形成、中でも骨芽細胞の分化におけるCBFA1/PEBP2 α A あるいはその標的遺伝子の役割の解明が進むことが考えられ、骨芽細胞の分化に対する作用を特徴とする骨粗鬆症の治療法あるいはその他の骨代謝異常症の治療法を確立する上での重要な情報が得られるものと期待される。なかでも、CBFA1/PEBP2 α A をコードする遺伝子の少なく*20

配列

CCGCACGACA ACCGCACCAT

20

【0065】配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CGCTCCGGCC CACAAATCTC

20

【0066】配列番号：3

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GAACCCCCAT TGCTGTCCCC

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0067】配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TCACAAGAGC AGTGAGCGCT

20

【0068】配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GTTGGAACG CGTTCCATT

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

【0069】配列番号：6

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GCGCATAAAC TGATCCATGT

20

【0070】配列番号：7

配列の長さ：21

配列の型：核酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

*とも一部からなるDNAは、骨形成用DNAとして遺伝子治療に使用することにより、骨髄細胞などの細胞内でCBFA1/PEBP2 α Aあるいはその一部分が高発現し、該細胞内において骨形成の行われることが期待されるので、骨粗鬆症、あるいはその他の骨代謝異常症に対する治療又は予防に有用である。

【0063】

【発明の効果】本発明により、CBFA1/PEBP2 α A の生体内での機能を解明するために有用なCBFA1/PEBP2 α A を

10 コードする遺伝子に変異を導入させたトランスジェニック動物および該トランスジェニック動物の作製方法が提供される。

【0064】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

※鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

★鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

☆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

◆鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

23

24

配列

CGTTCAATG TGTCCCTAGT C

【0071】配列番号：8

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

GGTCATCTTC ATTGTCCACT C

【0072】配列番号：9

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

AGGGAATTCA GTGTTCTGC CACCTCT

【0073】配列番号：10

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

CCTCTGAAAT GAAAGGGCGA TCTA

【0074】配列番号：11

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

TGAAGTCTGC GTGGCCGTGT GG

【0075】配列番号：12

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

CTATGGCAAT CCCCCAGCGGA GG

【0076】配列番号：13

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TGTACCGCAG GCACTCAGGC

【0077】配列番号：14

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GGTGTGTCCC TGTGTGGTCC

【0078】配列番号：15

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CGGCCGTCA TCCGGATTAC

【0079】配列番号：16

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CATTGTGATG GACTAGTCTG

【0080】配列番号：17

配列の長さ：20

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

21

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

27

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

24

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆20 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

25

26

配列

GGCGTGCACA CTCCTTGAAC

【0081】配列番号：18

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GTCCATCCCG AGTCACCACCA

【0082】配列番号：19

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

CCGATGGCTG GTTGTGCTCA T

【0083】配列番号：20

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

GCACAGACCA CAAGCAGCAG A

【0084】配列番号：21

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

GGCTTGCTT ATCTCTGTGA

【0085】配列番号：22

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

CTATTCAAGC TCTCGTCCAG

【0086】配列番号：23

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

AGATGAGAAG CCCAAGGTCA AC

【0087】配列番号：24

配列の長さ：22

配列の型：核酸

配列

GGTACCATAC TCCACGTCTC TG

【0088】配列番号：25

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

AATCAAGAAC GGCTGTGTGC A

【0089】配列番号：26

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

CATGCTGTGA AGACCCCTGTT T

【0090】配列番号：27

配列の長さ：22

配列の型：核酸

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆20 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

50 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

27

28

配列

GGACCAAGAGA CCCTTTGGGG GG

【0091】配列番号：28

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

GGCTGCTTTT GTAGGCTTCA GTGG

【0092】配列番号：29

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

CGCCCCAGCG AGACTCTGTG C

【0093】配列番号：30

配列の長さ：21

配列の型：核酸

配列

GCCCACGGGG TATCTGGGA A

【0094】配列番号：31

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

ATGCTGTTG AACTGCAGCG CATGTGCTGG

【0095】配列番号：32

配列の長さ：27

配列の型：核酸

配列

CCGCTCGAGC TTGCGGGCCC CGTTCAT

【0096】配列番号：33

配列の長さ：20

配列の型：核酸

配列

TGTACACTCT TCTTCTGGCA

【0097】配列番号：34

配列の長さ：24

配列の型：核酸

配列

ACAGATGTTG ATGTAGAAGA CAGG

【0098】配列番号：35

配列の長さ：26

配列の型：核酸

配列

CTATACTGGC AGTTCACCT GTCTGT

【0099】配列番号：36

配列の長さ：29

配列の型：核酸

配列

AGTGAGGGAT TTTTGACCCA GGAAGCAAA

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、ゲノムCBFA1/PEBP2 α A 遺伝子座のターゲッティングベクター、部分的な制限酵素地図、及び

* 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

22

24

※ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

※10 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

★ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

21

☆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

☆20 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

30

◆ 鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

27

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

20

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

24

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

40 配列の種類：他の核酸（合成DNA）

26

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

29

相同性組換えにより作成された変異対立遺伝子の構造を示した模式図である。図中、斜線のボックスはエクソン1を示し、黒塗りのボックスはPGK-neo 及びPGK-tkを示

す。B₁はBam HI部位を、C₁はCla I 部位を、B₂はBgl II 部位を、B₃はBst EII 部位を、N₁はNot I 部位を示す。3'側のCla I とBam HI部位の間のCla I 、Bgl II 及びBst EII 部位は決定していない。

【図2】図2は、胎児の肝臓由来のゲノムDNAをBam HIで切断し、図1に示したClaI-SalI *プローブ (*はクローニングベクターのサイトを示す) とハイブリダイズさせたサザンプロット分析の結果を示す電気泳動の写真である。各バンドは、WTマウス (12.5kb) 及び変異マウス (9.5kb) の遺伝子への対応を示している。

【図3】図3は、WTマウス (+/+) 、ヘテロ変異マウス (+/-) 及びホモ変異マウス (-/-) のd18.5 胎児の肝臓より抽出した全RNAを使用し、CBFA1/PEPB2 α A のrunt領域のRT-PCR分析を行った結果を示す電気泳動の写真である。図中Nは、PCR反応液中にcDNAを含まない陰性コントロールを示す。また図中Mは、分子量マーカーを示す。

【図4】図4は、WTマウス及びホモ変異マウスのd18.5 胎児のX線写真である。ホモ変異マウスでは、石灰化した骨格はほとんど見当たらない。

【図5】図5は、WTマウス、ヘテロ変異マウス及びホモ変異マウスのd15.5-d18.5 胎児及び新生児の骨格を、アリザリンレッド及びアルシアンブルーで染色した結果を示す、生物の形態の写真である（ただしd16.5はアリザリンレッドでのみ染色している）。図中、横棒は1cmに相当する。

【図6】図6は、d18.5 胎児の骨格の組織学的評価を行った結果を示す顕微鏡写真である。

AとB : ALP 及びフォンコッサ法により染色した脛骨の全体像を示す。WTマウス胎児では骨髄の発生が見られるが（A）、ホモ変異マウスではそれが見られない（B）。図中、横棒は1mmに相当する。

CとD : WTマウス胎児の骨幹では骨化及びALP陽性骨芽細胞が見られる（C）。ホモ変異マウスでは石灰化した軟骨は見られるが、骨膜下骨化は見られない。またALP陽性細胞は軟骨膜部分では観察されたが、軟骨への侵入は見られない（D）。これら（C）及び（D）は、（A）及び（B）の枠で囲んだ部分を拡大したものである。図中、横棒は0.2mmに相当する。

EとF : WTマウスでは骨髄中の海綿骨表面において、球状のALP陽性骨芽細胞が見られる（E）。ホモ変異マウスでは軟骨膜において、平らなALP陽性骨芽細胞が見られる（F）。これら（E）及び（F）は、（C）及び（D）の枠で囲んだ部分を拡大したものである。図中、横棒は20 μ mに相当する。

GとH : 脛骨を、TRAP及びフォンコッサ法で染色したものである。WTマウスでは、石灰化した骨表面にTRAP陽性の破骨細胞が多数見られる（G）。ホモ変異マウスでは、TRAP陽性破骨細胞が少數ではあるが石灰化軟骨周辺に出現している。しかしこれらの細胞の軟骨への侵入は

見られない（H）。図中、横棒は0.2mmに相当する。

IとJ : WTマウスの骨髄中には、大きくて多核の破骨細胞が見られる（I）。ホモ変異マウスの軟骨周辺には、小さくて単核の破骨細胞が見られる（J）。これら（I）及び（J）は、（G）及び（H）の枠で囲んだ部分を拡大したものである。図中、横棒は20 μ mに相当する。

KとL : WTマウス（K）およびホモ変異マウス（L）の頭蓋骨を、ALP、フォンコッサ法により染色したものである。図中、横棒は0.2mmに相当する。

MとN : WTマウスでは、骨化及び球形のALP陽性骨芽細胞が見られる（M）。ホモ変異マウスでは骨化は見られず、ALP陽性骨芽細胞も平らである（N）。図中、横棒は20 μ mに相当する。

【図7】図7は、OSN、OSP、OSC 及びMGP のmRNAの分布を調べたin situ ハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真である。A、C、E、G及びIは、d18.5 のコントロール (+/-) 胎児由来のとう骨を用いており、B、D、F、H及びJは、d18.5 のホモ変異マウス (-/-) 胎児由来のとう骨を用いている。AとBは、ヘマトキリシン及びエオシンで染色したものである。CとDはOSNのアンチセンスプローブを用いた結果である。EとFはOSPのアンチセンスプローブを用いた結果である。GとHはOSCのアンチセンスプローブを用いた結果である。IとJはMGPのアンチセンスプローブを用いた結果である。図中、横棒は0.15mmに相当する。

【図8】図8は、ALP、OSP 及びOSC 遺伝子の発現を調べたノーザンプロット分析の結果を示す電気泳動の写真である。d18.5 のコントロール (+/-) 及びホモ変異マウス (-/-) 胎児の骨格より抽出した全RNAを、1レーンあたり15 μ g 泳動している。GAPDH（グリセラルデヒド-3-ホスフェート-デヒドロゲナーゼ）プローブとのハイブリダイゼーションは、各RNAサンプルを等量泳動したことを示すための内部標準として行った。

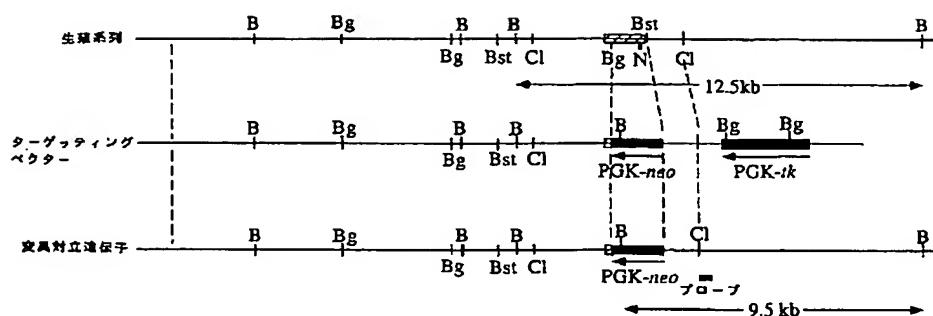
【図9】図9は、TGF β スーパーファミリーとその受容体、IGF とその受容体及びM-CSF 遺伝子の発現を調べたRT-PCRの結果を示す電気泳動の写真である。d18.5 のWTマウス (+/+) 及びホモ変異マウス (-/-) 胎児の頭蓋骨由来細胞（a）、骨格（b）及び皮膚（c）由来のRNAを、分析に用いている。

【図10】図10は、d18.5 のWTマウス及びホモ変異マウス胎児由来の頭蓋骨由来細胞における、ALP活性に対するrhBMP-2の効果（AとB）及びOSCの産生に対するrhBMP-2の効果（C）を示したグラフである。ALP活性は、3日後（A）、あるいは6日後（B）に測定した。OSCの濃度は、6日後（C）に測定した。いずれもrhBMP-2の濃度を変化させて、測定した。

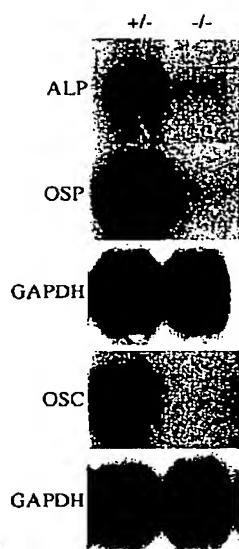
【図11】図11は、d18.5 のWTマウス (+/+) 、ヘテロ変異マウス (+/-) 及びホモ変異マウス (-/-) 由来の胸腺細胞、肝臓細胞及び脾臓細胞のFACS分析の

結果を示す図である。

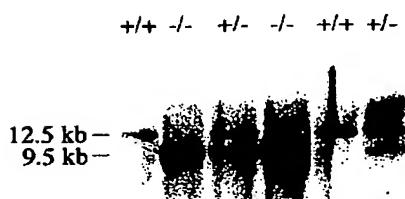
【図 1】



【図 8】



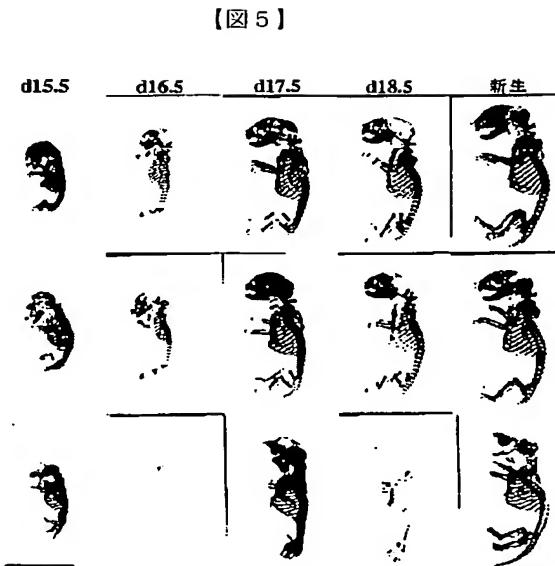
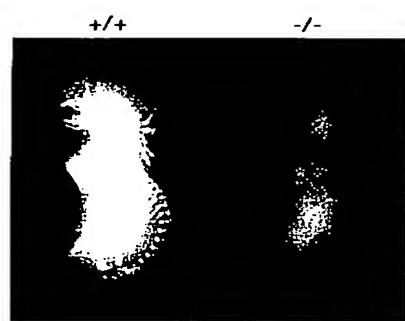
【図 2】



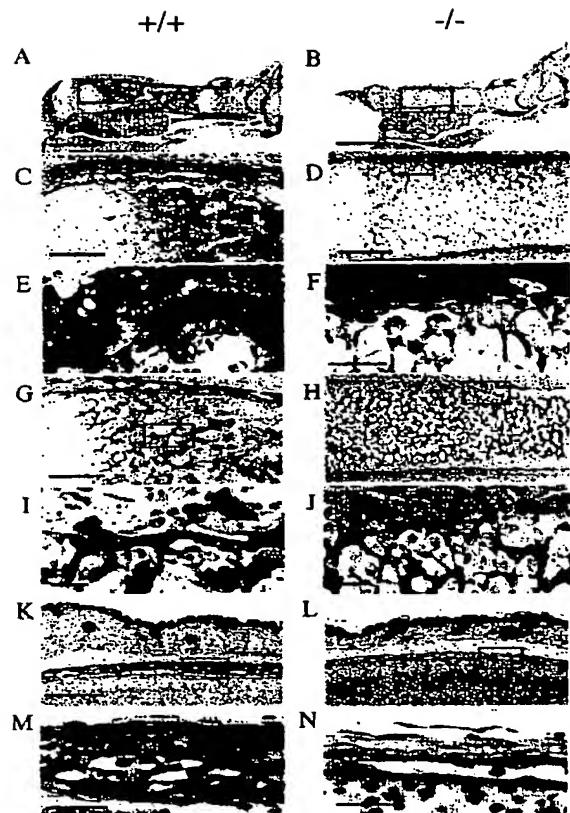
【図 3】



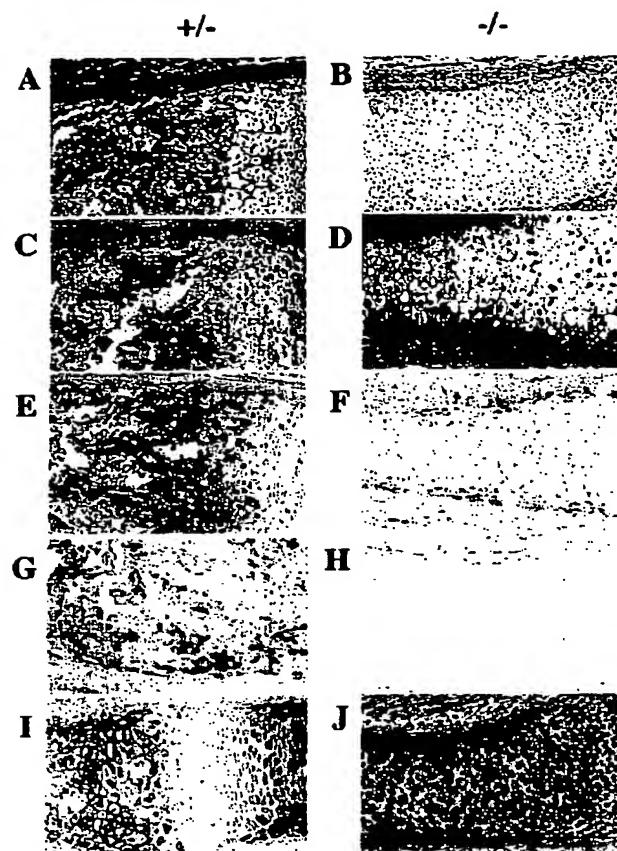
【図 4】



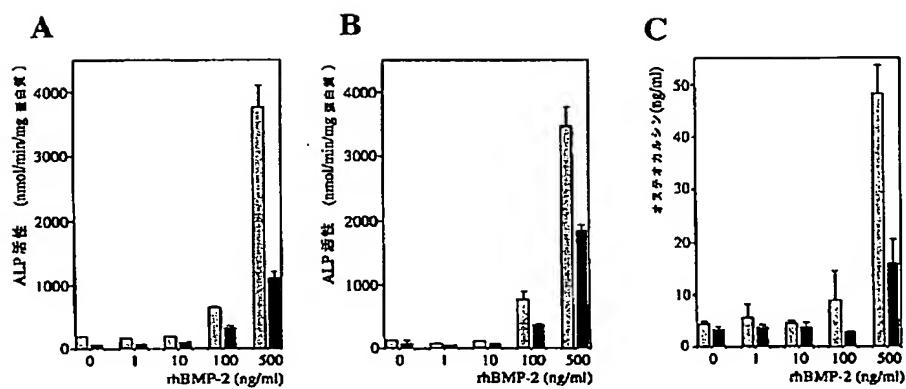
【図6】



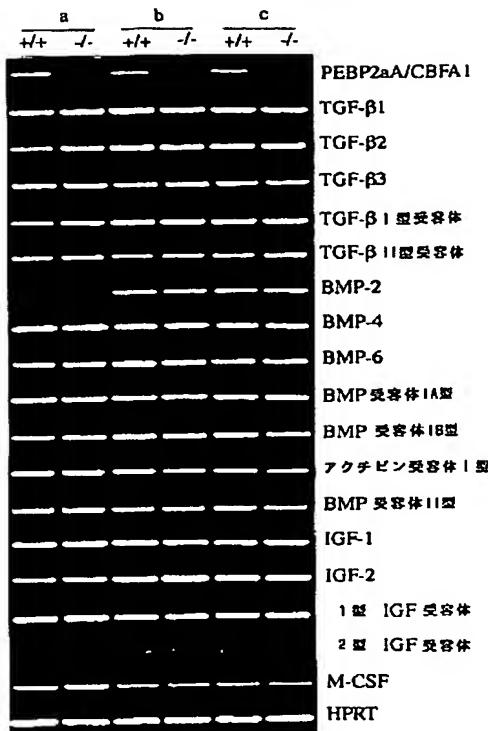
【図7】



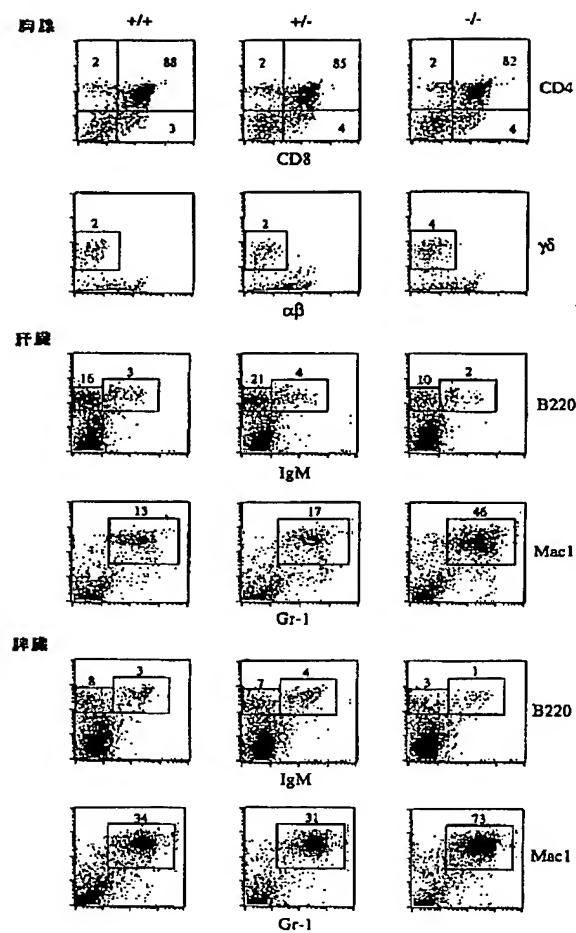
【図10】



【図9】



【図11】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.